

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 61-155757

(43)Date of publication of application : 15.07.1986

(51)Int.Cl.

G01N 33/68

G01N 21/77

(21)Application number : 59-278282

(71)Applicant : WAKO PURE CHEM IND LTD

(22)Date of filing : 27.12.1984

(72)Inventor : TOKUDA KUNIAKI

FURUYA SHIN

OSAWA SUSUMU

YOSHIZAKI HIDEKIYO

OKUBO AKIYUKI

KAMEI SACHIKO

WATANABE NOBUKO

MAKINO KAZUO

## (54) ASSAY OF TRACE PROTEIN

## (57)Abstract:

PURPOSE: To enable highly accurate measurement of protein in urine, by adding a chelate agent allowed to bond to molybdenum into a measuring reagent mainly composed of pigment and molybdenum or by adding metal ion allowed to bond to oxalic acid, citric acid and phosphor and salts thereof expected coexist in a sample but failing to react with the pigment beforehand to avoid phenomenon indicating a negative value by normal urine.

CONSTITUTION: Pigment such as pyrogallol red and pyrocatechol violet forms a complex with molybdenum, which shifts the wavelength to the long wavelength side as protein. When a colorimetric assay of protein, especially urinous protein utilizing this, a chelate agent existing in a sample, potentially causing a negative value, namely, organic acid or/and phosphates or a chelate agent having the same action as these is added to a reagent beforehand or metal ion allowed to bond to oxalic acid, citric acid, phosphoric acid and salts thereof expected to coexist in the sample, but failing to react with said pigment is added thereto. The chelate therein used is ethylene diamine tetraacetate (EDTA), tripolyphosphoric acid, metaphosphoric acid or the like. The addition thereof shall be normally in a range of 0.001W1%.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

## ⑫ 公開特許公報(A) 昭61-155757

⑪ Int. Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和61年(1986)7月15日

G 01 N 33/68  
21/778305-2G  
6637-2G

審査請求 未請求 発明の数 1 (全11頁)

⑭ 発明の名称 微量蛋白定量法

⑮ 特 願 昭59-278282

⑯ 出 願 昭59(1984)12月27日

⑰ 発 明 者	徳 田	邦 明	川越市の場515の13
⑰ 発 明 者	降 矢	震	千葉市亥鼻1-8-1 千葉大学亥鼻宿舍1-504
⑰ 発 明 者	大 澤	進	四街道市みそら4-17-9
⑰ 発 明 者	好 崎	英 清	千葉市作草部町908-RB-507
⑰ 発 明 者	大 久 保	昭 行	埼玉県南埼玉郡宮代町須賀1611-26
⑰ 発 明 者	亀 井	幸 子	東京都文京区西片1-1-6
⑰ 発 明 者	渡 辺	信 子	浦和市西堀524-1
⑰ 発 明 者	牧 野	和 夫	東京都豊島区要町3丁目20番地
⑰ 出 願 人	和光純薬工業株式会社		大阪市東区道修町3丁目10番地

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

微量蛋白定量法

## 2. 特許請求の範囲

(1) モリブデンと錯体を形成し、さらに蛋白の存在で波長がシフトする色素を使用した微量蛋白定量法に於て、試薬中にあらかじめモリブデンと結合するキレート剤を添加するか、又は前記色素とは反応せず、試料中に共存が予想されるシュウ酸、クエン酸、リン酸及びこれらの塩と結合し得る金属イオンを添加することを特徴とする微量蛋白定量法。

(2) 微量蛋白が尿蛋白である、特許請求の範囲第1項記載の定量法。

(3) キレート剤が、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、ヒドロキシエチルエチレンジアミン三酢酸(EDTA-OH)、エチレンジアミン二酢酸(EDDA)、イミノ二酢酸(IDA)、ニトリロプロピオン酸(NTP)、ニトリロ三酢酸(NTA)、ヒドロキシエチルイミノ二酢酸(

HIDA)、クエン酸、酒石酸、シュウ酸、1-ヒドロキシエタン1,1-ジホスホン酸、ピロリン酸、ヘキサメタリン酸、トリポリリン酸、メタリン酸、及びこれらの塩類の内、1種又は2種以上である特許請求の範囲第1項又は第2項記載の定量法。

(4) 金属イオンがアルミニウムイオン又は/及びセリウムイオンである特許請求の範囲第1項又は第2項記載の定量法。

(5) 色素がピロガロールレッド又はピロカテコールバイオレットである特許請求の範囲第1項～第4項のいずれかに記載の定量法。

## 3. 発明の詳細な説明

本発明は、蛋白、特に尿蛋白の微量比色定量法に関する。

健康な人でも毎日尿中に20～80mgの蛋白質を排泄するといわれているが、この排泄される蛋白質は通常粒子が小さく糸球体を通過し易いアルブミンが主体である。一方、溶血がひどく血漿内に赤血球のヘモグロビンが多量に遊出しこれが腎

糸球体から漏れたり、あるいは腎臓や尿路に炎症がある場合などには白血球を尿中に放出するので、グロブリンを主体とする尿蛋白となる。尿蛋白は一般に次のような場合に高値となり腎疾患の重要な指針となる。

- (1) 急性、および慢性腎炎、ネフローゼ。
- (2) 心不全による腎の鬱血、その他。
- (3) 熱性蛋白尿。
- (4) 化学薬品中毒、細菌性中毒。
- (5) 白血病、紫斑病。
- (6) 狭窄、結石、腫瘍による尿管の閉塞。
- (7) 脳腫瘍、癲癇、その他中枢神経系疾患、精神感動。
- (8) 膿、血液、精液などの混入。
- (9) 卵など分子量の小さい蛋白質の多量摂取。
- (10) 激しい運動、熱い湯又は冷水に長時間つかった後に現われる一過性のもの。
- (11) 体位性および若年性蛋白尿。

現在、一般に行なわれている尿蛋白測定を主体とする微量蛋白定量法としては下記の如き方法が

(6) トリクロル酢酸沈澱によるピウレット法  
(検体(原尿) 2 ml + 蒸留水 2 ml + トリクロル酢酸 (10% 溶液) 混和後 3,000 rpm で5分以上遠心後上清を捨てる。沈澱にピウレット試薬 (NaOH 4%, 酒石酸カリウムナトリウム結晶 1.5%,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.5%, ヨウ化カリウム 0.5%) 2 ml + 蒸留水 2 ml 混和後、37℃、30分間加温し 540 nm で比色)

これらの内、スルホサリチル酸法、煮沸試験法、Robers 法は、比濁法又はそれに準ずる方法で多量の試料を必要とし、しかも定量分析に適用するには精度的に限界がある。一方クマシーブリリアントブルー法は比色法であるが、検量線が湾曲することや、セル、試験管等の汚染があることなどから多数検体を連続処理するにはそぐわないものとされている。

又、トリクロル酢酸沈澱によるピウレット法は、沈澱分離操作を必要とするので操作が繁雑であり実用的ではない。

一方、分析化学 Vol. 32 379 ~ 386

ある。

(1) スルホサリチル酸法 (鋭敏度 0.002%)  
(透明尿 4 ~ 5 ml + スルホサリチル酸 20 W/V % 溶液 2 ~ 3 滴 → 白色混濁又は沈澱を生ずれば蛋白陽性)

(2) 煮沸試験法 (鋭敏度 約 0.005%)  
(透明尿 5 ml を 1 ~ 2 分間煮沸し、混濁を生じたならば熱時 5% 酢酸、又は 70% 硝酸を 1 ~ 3 滴添加し、混濁が不変又は増加した場合は蛋白陽性)

(3) Robers 法 (鋭敏度 0.003%)  
(試料と硫酸マグネシウムの硝酸溶液とを等容混合し境界面に白輪が生ずれば蛋白陽性)

(4) 試験紙法 (鋭敏度 0.03%)  
(テトラブロムフェノールブルーの蛋白呈色性を利用)

(5) クマシーブリリアントブルー法  
(鋭敏度 0.001%)  
(色素と蛋白の結合による高感度測定法で、試料 50  $\mu\text{l}$  + CBB-G 250 溶液 3 ml → 595 nm の吸光度を測定)

(1983) によれば、ピロガロールレッドとモリブデン酸塩混合物 (PR-モリブデン錯体) に蛋白 (アルブミン) を添加すると  $\lambda_{\text{max}}$  が長波長側にシフトし蛋白を高感度で比色定量することが可能であるとの記載がある。しかしながら、文献記載の試薬に試料として健康人の尿 (スルホサリチル酸法で陰性) を使用して蛋白濃度を測定すると殆どどの検体で吸光度が試薬ブランクより低値となり蛋白濃度として負値が算出される現象に遭遇する。従って、この方法をそのまま人尿検体を試料とした尿蛋白の測定に適用することは不可能である。

かかる状況に鑑み、本発明者らはモリブデンと錯体を形成し、更に蛋白の存在で波長がシフトする色素を用いる尿蛋白の測定法の実用化について鋭意研究を重ねた結果、色素及びモリブデンを主成分とする測定試薬中に予めモリブデンと結合し得るキレート剤を添加するか、又は前記色素とは反応せず、試料中に共存が予想されるシュウ酸、クエン酸、リン酸、及びこれらの塩と結合し得る

金属イオンを添加することにより、その目的を達成し得ることを見出し本発明を完成するに到った。

即ち、本発明はモリブデンと錯体を形成し、さらに蛋白の存在で波長がシフトする色素を使用した微量蛋白定量法に於て、試薬中にあらかじめモリブデンと結合するキレート剤を添加するか、又は前記色素とは反応せず、試料中に共存が予想されるシュウ酸、クエン酸、リン酸及びこれらの塩と結合し得る金属イオンを添加することを特徴とする微量蛋白定量法である。

本発明は、ピロガロールレッド、ピロカテコールバイオレット等の色素がモリブデンと錯体を形成し、この錯体が蛋白と結合して波長が長波長側にシフトすることを利用して蛋白、特に尿蛋白の比色定量を行うに当り、試料中に存在し、負値の原因となるキレート剤、即ち有機酸又はノ及びリン酸塩類、又はこれらと同じ作用をもつキレート剤を予め試薬中に添加しておくか、又は前記色素とは反応せず、試料中に共存が予想されるシュウ酸、クエン酸、リン酸、及びこれらの塩と結合し

得る金属イオンを添加しておくことにより、正常尿が負値を示す現象を回避し、極めて高精度に尿中蛋白の測定を行うことを可能ならしめたものである。

即ち、ピロガロールレッド、ピロカテコールバイオレット等の色素類は、モリブデンと錯体を形成して着色する（或いは着色が増す）が、モリブデンと結合力のある他のキレート剤が存在すると、モリブデンの一部はこれら色素類との結合から離れ他のキレート剤と結合し、この為試薬盲検値が低下する。試薬中にキレート剤を徐々に添加していくと盲検値は添加量に従って徐々に低下し、ある添加量を越えると試料に由来するキレート剤が混入されてきてもはやそれ以上に低下する現象が殆んど認められなくなり負値を示さなくなる。又同様に試薬中にアルミニウムイオン、セリウムイオン等を添加すると試料中のキレート剤（シュウ酸、クエン酸、リン酸等）はアルミニウムイオン、セリウムイオン等と結合してモリブデンとは結合しなくなり（又は結合する割合が少なくなり）

である。

本発明に於て用いられるキレート剤としては、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）、ヒドロキシエチルエチレンジアミン三酢酸（EDTA-OH）、エチレンジアミン二酢酸（EDDA）、イミノ二酢酸（IDA）、ニトリロプロピオン酸（NTP）、ニトリロ三酢酸（NTA）、ヒドロキシエチルイミノ二酢酸（HIDA）、クエン酸、酒石酸、シュウ酸、1-ヒドロキシエタン1,1-ジオホスホン酸、ピロリン酸、ヘキサメタリン酸、トリポリリン酸、メタリン酸等が挙げられる。その添加量は添加するキレート剤により異なるが、通常0.001～1%の範囲で蛋白測定条件下でのそのキレート剤のキレート生成定数や溶解度を考慮して適宜選択すれば良い。又、これらは単独で用いても2種類以上の混合物で用いても良く、又溶解性を増す為にこれらをナトリウム、カリウム、リチウム等のアルカリ金属塩やアンモニウム塩等として塩の形で添加してもよい。

又本発明に使用可能な金属イオンとしては、ア

負値を回避することができる。従って、測定試薬中に予めモリブデンと結合し得るキレート剤、若しくはアルミニウムイオン、セリウムイオン等の金属イオンを添加しておくことにより、正常尿が負値を示す現象は解消されると同時に、モリブデンと結合するキレート剤やアルミニウムイオン、セリウムイオン等を含んだ状態の高濃度の蛋白含有試料についても正確な測定が可能となる。

本発明者らは、モリブデンと錯体を形成し、更に蛋白の存在で波長がシフトする色素を使用した尿蛋白の定量法に於て、これまで解明されていなかった正常尿が負値を示す原因について究明し、その解決方法として、本発明者ら独自の知見に基づいて上記結論を導き出し本発明に到達した。

本発明の方法によれば、正常尿が負値を示すこともなく、検量線は直線性に優れ定量性が良好であり再現性も良好である。又、クマシーブリリアントブルー法のように、セルや試験管等を汚染するようなこともないので多数検体を連続処理するのにも適しており、自動分析装置への適用が可能

ルミニウムイオン、セリウムイオン(II,IV)等が適当である。本発明に於て使用可能な色素としては、モリブデンの存在下アルブミンと定量的に錯体を形成するピロガロールレッド(PR)、プロムピロガロールレッド、ピロカテコールバイオレット(PV)、 $\alpha$ -ヒドロキシヒドロキノンフタレン、ガレイン等の色素が挙げられる。これら色素類の使用量は通常0.005~0.01%である。又これら色素類と錯体を形成するモリブデンは、通常モリブデン酸のアンモニウム塩、若しくはアルカリ金属塩として用いられるがこれらに限定されるものではない。その使用量は例えばモリブデン酸塩の場合、モリブデン酸イオンの濃度として通常0.005~0.01%程度が用いられる。

表1にPR-MoO<sub>4</sub>処方におけるキレート剤の添加効果を示す。キレート剤の添加により正常尿での測定値が負値より正值となることが判る。又、キレート剤種や添加量を選択すれば、アルブミンに対する感度も上昇しさらにアルブミンとグロブ

リンの発色比も改善される。

以下余白



表1  
PR-MoO<sub>4</sub>法 キレート剤添加効果

キレート剤	試薬 フタラ	正常尿 吸光度	正常尿 吸光度 (フタラ)	アルブミン 100mg/dl (フタラ)	G/A
なし	0.363	0.342	-0.021	0.306	65%
EDTA-2Na(0.1%)	0.270	0.289	0.019	0.456	75%
EDTA-UH(0.1%)	0.205	0.226	0.021	0.434	83%
EDDA(0.03%)	0.352	0.370	0.018	0.327	76%
IDA(0.1%)	0.323	0.340	0.017	0.415	80%
NTP(0.05%)	0.359	0.376	0.017	0.336	69%
NTA(0.1%)	0.164	0.182	0.018	0.409	77%
HIDA(0.1%)	0.284	0.310	0.026	0.500	73%
クエン酸(0.05%)	0.232	0.250	0.018	0.330	83%
酒石酸(0.05%)	0.241	0.259	0.018	0.342	81%
シュウ酸Na(0.05%)	0.140	0.160	0.020	0.319	88%
1-ヒドロキシエチル- ジホスホン酸(0.01%)	0.299	0.335	0.036	0.502	67%
ピロリン酸(0.1%)	0.348	0.370	0.022	0.458	65%
ヘキサメチリン酸(0.02%)	0.281	0.303	0.022	0.321	69%
トリメチリン酸(0.1%)	0.274	0.310	0.036	0.507	70%
メチリン酸(0.02%)	0.283	0.309	0.026	0.316	73%

(但し、表中のG/Aはアルブミンとグロブリンの発色比を表わす。)

試料	スルホサリチル酸法で蛋白活性度 100μg	試料 100μg + 試薬 3.0ml
試薬	ピロガロールレッド 20mg/g NH <sub>4</sub> MoO <sub>4</sub> 30mg/g グリシン-HCl - 緩衝液 pH 2.5 アモニウム系界面活性剤 0.1%	→ 600nmの吸光度測定 (水対照 30分放置)

表2に PV-MoO<sub>3</sub> 処方に於けるキレート剤の添加効果を示す。表1同様キレート剤の添加により正常尿での測定値が負値より正值となり、添加するキレート剤の種類と量を選択すれば、アルブミンに対する感度が上昇しアルブミンとグロブリンの発色比も改善される。

以下余白



表 2  
PV-MoO<sub>3</sub> 法 キレート剤添加効果

キレート剤	試薬 ブランク	正常尿 吸光度	正常尿 吸光度 (-ブランク)	アルブミン 100mg/dl (-ブランク)	G/A
なし	0.460	0.324	-0.136	0.370	54%
EDTA-2Na(0.1%)	0.140	0.145	0.005	0.455	65%
EDTA-OH(0.1%)	0.052	0.057	0.005	0.398	72%
NTA(0.03%)	0.054	0.061	0.007	0.394	69%
HIDA(0.1%)	0.098	0.106	0.008	0.467	73%
クエン酸(0.05%)	0.046	0.052	0.006	0.410	65%
酒石酸(0.05%)	0.051	0.056	0.005	0.402	66%
シュウ酸Na(0.02%)	0.024	0.029	0.005	0.383	62%
1-ヒドロキシエチル- ジカスホン酸(0.1%)	0.092	0.101	0.009	0.458	62%
ピロリン酸(0.1%)	0.260	0.272	0.012	0.469	58%
トリポリリン酸(0.1%)	0.048	0.057	0.009	0.440	59%

(但し、表中のG/Aはアルブミンとグロブリンの発色比を表わす。)

試料	スルホサリチル酸法で蛋白定性尿	100μg
試薬	ピチカチコールバイオレット	40mg/g
	モリブデン酸アンモニウム	60mg/g
	NaCl-HCl(0.1M)緩衝液(pH2.0)	
	トリトンX-405	0.3%

試料100μg+試薬3.0ml

→660nmの吸光度測定(水対照、30分放置)

表3に PR-MoO<sub>4</sub> 処方に於けるアルミニウムイオン及びセリウムイオンの添加効果を示す。又、表4に PV-MoO<sub>4</sub> 処方に於けるアルミニウムイオン及びセリウムイオンの添加効果を示す。いずれもキレート剤を添加した場合と同様正常尿での負値を回避している。

表 3

PR-MoO<sub>4</sub> 法 アルミニウムイオン、セリウムイオンの添加効果

金属イオン	試薬 ブランク	正常尿 吸光度	正常尿 (-ブランク)	アルブミン 100mg/dl (-ブランク)
なし	0.450	0.324	-0.136	0.370
酢酸セリウム 0.005%	0.443	0.451	0.008	0.341
硫酸アルミニウム 0.02%	0.472	0.483	0.011	0.359

(測定方法は表1の場合に準ずる。)

以下余白



ユウ酸で0.3~0.7 mg/kg/day程度存在する。)程度では殆んど影響を受けない。いずれの場合もEDTAの添加にも拘わらず良好な検量線が得られ、それにより定量性は何ら損なわれていない。

以上述べた如く、本発明は微量蛋白、特に尿蛋白の改良された測定法、即ち、定量性、再現性に優れた高精度の測定法で有り、且つ又、セルや試験管等の汚染もないので自動分析装置への適用が可能な優れた測定法を提供するものであり、斯業に貢献するところ極めて大である。

以下に実施例を示すが、本発明はこれら実施例により何ら限定されるものではない。

#### 実施例1

##### 試薬

ピロガロールレッド	20 mg
モリブデン酸アンモニウム	3.0 mg
シュウ酸ソーダ	100 mg
アニオン系界面活性剤	100 mg
グリシン	7.5 g

これらを水900 mlに溶解してHClでpH2.5

表 4

PV-MoO<sub>4</sub> 法 アルミニウムイオン、セリウムイオンの添加効果

金属イオン	試薬 ブランク	正常尿 吸光度	正常尿 (-ブランク)	アルブミン 100mg/dl (-ブランク)
なし	0.460	0.324	-0.136	0.370
酢酸セリウム 0.005%	0.443	0.451	0.008	0.341
硫酸アルミニウム 0.02%	0.472	0.483	0.011	0.359

(測定方法は表2の場合に準ずる。)

第1図に PV-MoO<sub>4</sub> 処方に於てキレート剤としてEDTA(0.07%)を選択し、人アルブミンを使用して作成した検量線を示す。尚、キレート剤の添加量 0.03%、0.04%、0.05%、0.06%の場合もほぼ同様の結果が得られる。即ち、添加するキレート剤の量により、試薬ブランク値は僅かに変動するが測定値に影響を与えるほどではない。ましてや尿中に含まれるキレート剤の量(通常クエン酸で3~20 mg/kg/day、シ

とし、全量を1 lとした。

#### 操作法

5倍希釈尿20 μlに試液1.25 mlを加え、測定波長600/660 nm反応時間11分の測定条件で日立726型自動分析装置で測定した。

本実施例に於いて直線性を調べた結果を第2図に、再現性を調べた結果を表5に、従来法(トリクロル酢酸沈澱によるピクレット法)との相関図を第3図に夫々示す。第2図より明らかな如く、この条件下で少なくとも1200 mg/dlまでは直線性を示す。又、表5より明らかな如く再現性も良好でセル汚染等、従来の比色定量法であるクマシーブリリアントブルー法にみられた欠点は全て解消されていることが判る。又、第3図より明らかな如く、本法とトリクロル酢酸沈澱によるピクレット法とは相関係数0.996とよい相関を示している。(Y=1.03X-8.34)

以下余白



表 5

No	測定値 (mg/dl)	No	測定値 (mg/dl)
1	482	21	484
2	477	22	480
3	482	23	476
4	471	24	485
5	482	25	483
6	478	26	477
7	485	27	482
8	490	28	488
9	477	29	476
10	477	30	483
11	487	31	473
12	486	32	482
13	475	33	482
14	470	34	480
15	479	35	482
16	474	36	482
17	477	37	480
18	478	38	469
19	482	39	489
20	480		

n	39
max	490
min	469
$\bar{x}$	480.05
SD	4.994
CV	1.04%

## 実施例 2

## 試薬

ピロカテコールバイオレット	30 mg
モリブデン酸アンモニウム	40 mg
塩化ナトリウム	5.8 g
EDTA-2Na	500 mg
トリトンX-405	3 g

これらを水900 mlに溶解後HClでpH2.0とし全量を1 lとした。

## 操作法

5倍希釈尿20  $\mu$ lに試液1.25 mlを加え、測定波長 660 / 700 nm 反応時間11分の測

定条件で日立726型自動分析装置で測定した。

本実施例と従来法(トリクロル酢酸沈澱によるピウレット法)との相関図を第4図に示す。第4図より明らかな如く、本法とトリクロル酢酸沈澱によるピウレット法との相関係数0.993とよい相関を示している。(Y=1.04X-19.97)

## 4. 図面の簡単な説明

第1図は、P.V-MoO<sub>4</sub>処方にてキレート剤としてEDTA(0.07%)を選択し、人アルブミンを使用して作成した検量線を示し、横軸の各蛋白濃度について得られた吸光度(OD)を縦軸に沿ってプロットした点を結んだものである。

第2図は、実施例1に於いて直線性を調べた結果を示したものであり、横軸の各希釈系列について求めた蛋白濃度(mg/dl)を縦軸に沿ってプロットした点を結んだものである。

第3図は、実施例1に於ける本法で得られた蛋白濃度測定値と従来法(トリクロル酢酸沈澱によるピウレット法)で得られた蛋白濃度測定値との相関を表わし、横軸Xは従来法に於ける蛋白濃度

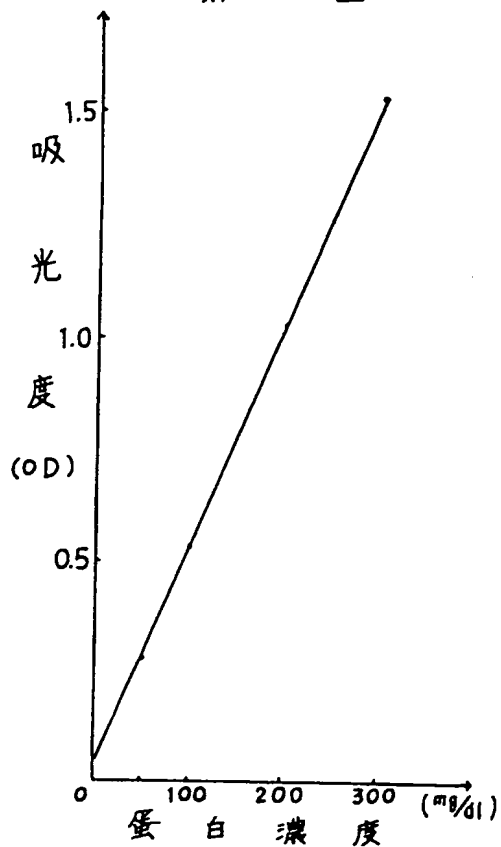
測定値(mg/dl)を、縦軸Yは本法に於ける蛋白濃度測定値(mg/dl)を夫々表わす。

第4図は、実施例2に於ける本法で得られた蛋白濃度測定値と従来法(トリクロル酢酸沈澱によるピウレット法)で得られた蛋白濃度測定値との相関を表わし、横軸Xは従来法に於ける蛋白濃度測定値(mg/dl)を、縦軸Yは本法に於ける蛋白濃度測定値(mg/dl)を夫々表わす。

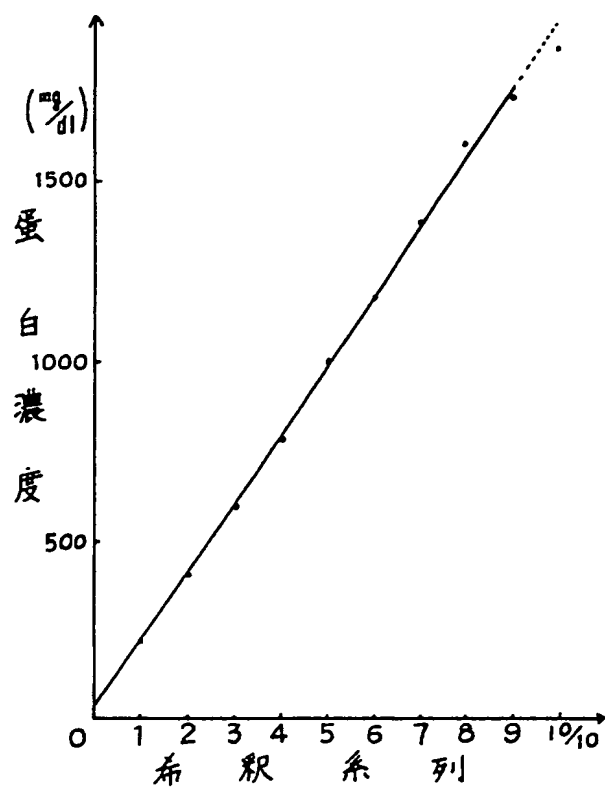
特許出願人 和光純薬工業株式会社



第 1 図

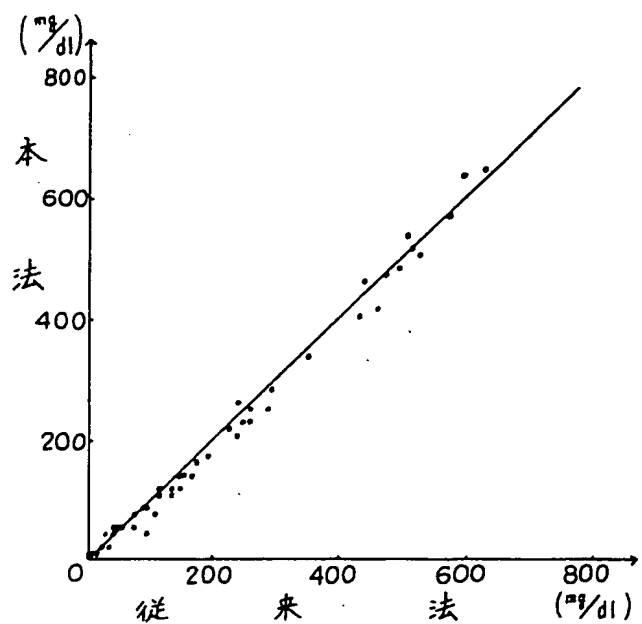


第 2 図

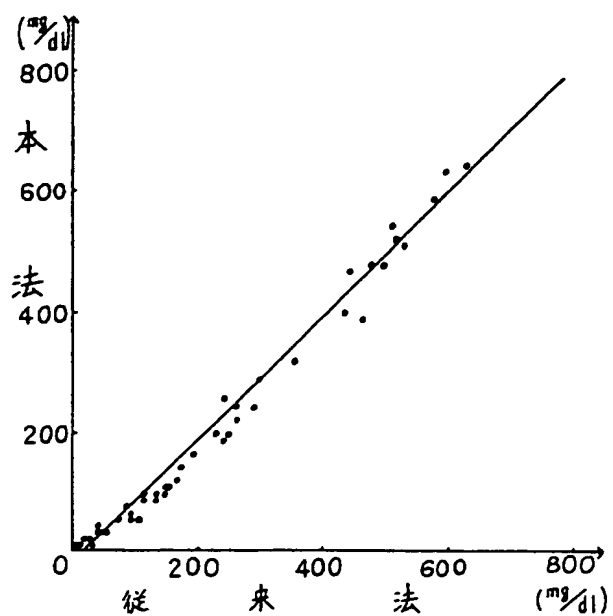


1031

第 3 図



第 4 図



## 手続補正書

昭和60年4月22日 適

特許庁長官 殿

## 1. 事件の表示

昭和59年特許願第278282号

## 2. 発明の名称

微量蛋白定量法

## 3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

郵便番号 541

住所 大阪府大阪市東区道修町3丁目10番地  
連絡先 TEL 03-270-8571

名称 和光純薬工業株式会社

代表者 伊力生

## 4. 補正命令の日付

自 発

## 5. 補正の対象

明細書の発明の詳細な説明の欄。

## 6. 補正の内容

(1)明細書16頁に記載の表3を以下のとおり補正する。

表 3

PR-MoO<sub>4</sub>法 アルミニウムイオン、セリウムイオンの添加効果

金属イオン	試薬 ブランク	正常尿 吸光度	正常尿 (-ブランク)	アルブミン 100mg/dl (-ブランク)
なし	0.383	0.342	-0.021	0.306
酢酸セリウム 0.005%	0.342	0.347	0.005	0.270
硫酸アルミニウム 0.02%	0.385	0.388	0.003	0.288

(測定方法は表1の場合に準ずる。)

以上

## 手続補正書

昭和60年5月25日

特許庁長官 殿

## 1. 事件の表示

昭和59年特許願第278282号

## 2. 発明の名称

微量蛋白定量法

## 3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

郵便番号 541

住所 大阪府大阪市東区道修町3丁目10番地  
連絡先 TEL 03-270-8571

名称 和光純薬工業株式会社

代表者 伊力生

## 4. 補正命令の日付

自 発

## 5. 補正の対象

明細書の発明の詳細な説明の欄。

## 6. 補正の内容

(1)明細書9頁20行目から10頁1行目にかけて記載の「自動分析装置への適用が可能である。」を「自動分析装置への適用が可能であり、又試験紙に適用することも可能である。」と補正する。

(2)明細書18頁7行目に記載の「高精度の測定法で有り、」を「高精度の測定法であって、試験紙に適用することも可能であり、」と補正する。

(3)明細書21頁9行目から22頁6行目にかけて記載の「実施例2」の後に「実施例3」を以下のとおり追加する。

## 「実施例3

## 試薬

ピロガロールレッド	100mg
モリブデン酸アンモニウム	150mg
酒石酸	2.5g
グリシン	7.5g

これらを水900mlに溶解してHClでpH 2.5と

# 手続補正書

昭和 60 年 5 月 27 日

特許庁長官 殿

査

し全量を1mlとした。この試液をろ紙に含浸させ乾燥して試験紙とした。

## 使用法

上記ろ紙に試料20μlを滴下した。30秒後に現われた青色を肉眼比色した。アルブミン、グロブリンとも10mg/dlまで検出可能であった。」

以上

## 1. 事件の表示

昭和59年特許願第278282号

## 2. 発明の名称

微量蛋白定量法

## 3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

郵便番号 541

住所 大阪府大阪市東区通修町3丁目10番地  
通称先 TEL 03-270-8571

名称 和光純薬工業株式会社

代表者 伊 力 一 生



## 4. 補正命令の日付

自 発

## 5. 補正の対象

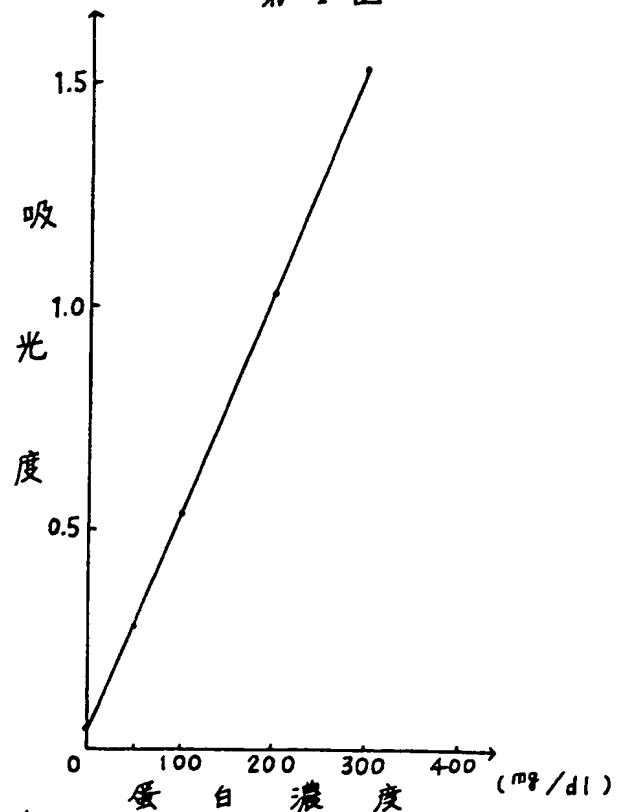
明細書の発明の詳細な説明の欄、及び図面。

## 6. 補正の内容

- (1)明細書9頁7行目に記載の「含んだ状態の」を「含んだ試薬を用いて」と補正する。
- (2)明細書9頁7行目から同頁8行目にかけて記載の「蛋白含有試料についても」を「蛋白含有試料について測定しても」と補正する。
- (3)明細書17頁14行目に記載の「検量線を示す。」の後に「(測定方法は表2の場合に準ずる。)」を挿入する。
- (4)明細書22頁11行目に記載の「吸光度(OD)」を「吸光度(水対照)」と補正する。
- (5)第1図、及び第2図を別紙のとおり補正する

以上

第1図



手続補正書

第 2 図

昭和 60 年 5 月 28 日

特許庁長官 殿



1. 事件の表示

昭和59年特許願第278282号

2. 発明の名称

微量蛋白定量法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

郵便番号 541

住所 大阪府大阪市東区通修町3丁目10番地  
電話 TEL 03-270-8571

名称 和光純薬工業株式会社

代表者 伊 力 一 生



4. 補正命令の日付

自 発

5. 補正の対象

明細書の発明の詳細な説明の欄。

6. 補正の内容

- (1)明細書11頁8行目に記載の「0.005~0.01%」を「0.0005~0.1%」と補正する。
- (2)明細書11頁14行目に記載の「0.005~0.01%」を「0.0005~0.1%」と補正する。

以上

